

SPR APPARATUS AND METHOD FOR SPR MEASURING USING POLARIZATION

Publication number: JP2001041881 (A)

Publication date: 2001-02-16

Inventor(s): SUZUKI KOJI; KURIHARA KAZUYOSHI; NIWA OSAMU; HIDA TATSUYA; IWASAKI GEN +

Applicant(s): JAPAN SCIENCE & TECH CORP; KANAGAWA KAGAKU GIJUTSU AKAD; NIPPON TELEGRAPH & TELEPHONE; NTT ADVANCED TECH KK +

Classification:

- international: G01N21/21; G01N21/27; G01N21/55; G01N21/75; G01N33/543; G01N21/21; G01N21/25; G01N21/55; G01N21/75; G01N33/543; (IPC1-7): G01N21/21; G01N21/27; G01N21/75; G01N33/543

- European: G01N21/55B2

Application number: JP19990216650 19990730

Priority number(s): JP19990216650 19990730

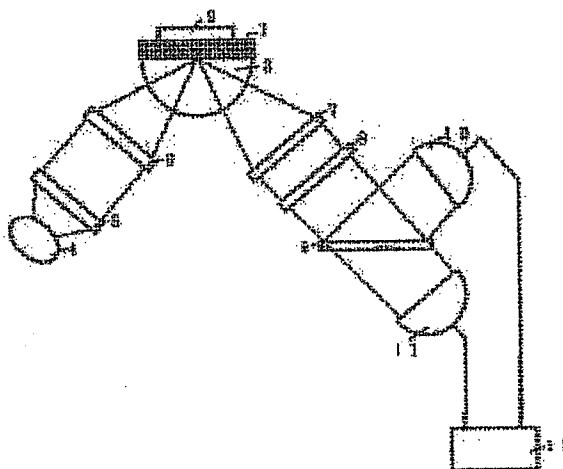
Also published as:

JP3778248 (B2)

Abstract of JP 2001041881 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To measure a simple, accurate, reliable and stable surface plasmon resonance (SPR) by dividing a polarization of a reflected light reflected on a metal thin film into a component p and a component s and measuring the respective components in an SPR apparatus.

SOLUTION: A specimen flows to a sample cell 2, and a chemical reaction, an interaction between substances or the like is taken place on a surface of a metal thin film 1. The film 1 is brought into close contact with a prism 3. A light irradiated from a light source 4 is condensed by optical system lenses 5 and 6, and reflected on the backside of the film 1 brought into close contact with the prism 3. The reflected lights are converged to parallel beams by an optical lens 7.; A polarization is regulated by a polarizing plate 8, and the parallel beams are separated into a component p and a component s of the polarization by a polarizing beam splitter 9. The respective components are measured by CCD cameras 10 and 11. Obtained image information is transferred to an information processor 12, data processed, and the data is then recorded.



(5) InCl ⁺		検測配号	P I	フーリエ(参考)	
G O I N	21/27		G O I N	21/27	C 2 G O 5 4
	21/21			21/21	Z 2 G O 5 9
	21/75			21/75	Z
	33/543	5 9 5		33/543	5 9 5
(21) 出願番号		特願平11-216650	審査請求 未請求 請求項の数22 O L (全 9 頁)		
(22) 出願日		平成11年7月30日(1999.7.30)			
		(71) 出願人	336920800 科学技術振興事業団 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 591243103		
		(71) 出願人	591243103 財団法人神奈川科学技術アカデミー 神奈川県川崎市麻生区坂戸3丁目2番1号 000004226		
		(71) 出願人	日本電信電話株式会社 東京都千代田区大手町二丁目3番1号 100102868		
		(74) 代理人	弁理士 佐伯 憲生		
		図表頁に続く			

(57) 【要約】
【課題】 本発明は、簡便で、高精度、高精度で、高信頼性で、かつ安定したS P Rの測定が可能な新規なS P R装置及びその測定方法を提供するものである。また、本発明はリアルタイムの化学反応、特に抗原－抗体反応などに代表される反応、錯体形成反応などの非共有結合形成反応、受容体との反応などを高精度、高精度、高信頼性で測定できる新規な装置及び測定方法を提供するものである。
【解決手段】 本発明は、表面プラズモン共鳴 (S P R) 装置において、金属薄膜で反射された反射光の偏光を測定し得る装置を有していることを特徴とする表面プラズモン共鳴 (S P R) 装置及びそれを用いたS P Rの測定方法に関する。より詳細には、入射光が通常光の場合には、これを偏光にし、好ましくはそれを偏光のp成分とs成分とにして、これを測定することを特徴とするものである。また、入射光が偏光の場合には、反射光の偏光のp成分とs成分を測定することを特徴とするものである。

1

(2)

2

特開2001－41881

【特許請求の範囲】
【請求項1】 表面プラズモン共鳴 (S P R) 装置において、金属薄膜で反射された反射光の偏光を測定し得る装置を有していることを特徴とする表面プラズモン共鳴 (S P R) 装置。
【請求項2】 反射光を偏光に分ける装置を有することを特徴とする請求項1に記載の装置。
【請求項3】 反射光を偏光に分ける装置が、偏光のp成分とs成分を測定可能なものである請求項2に記載の装置。
【請求項4】 反射光の偏光のp成分とs成分を同時に測定する請求項1～3のいずれかに記載の装置。
【請求項5】 入射光が偏光である請求項1に記載の装置。
【請求項6】 反射光の偏光のp成分とs成分の測定値を比較する装置を有する請求項1～5のいずれかに記載の装置。
【請求項7】 偏光のp成分とs成分との比較が、両者の商又は差である請求項6に記載の装置。
【請求項8】 偏光のp成分とs成分との比較が、両者の位相差である請求項6に記載の装置。
【請求項9】 反射光における偏光のp成分とs成分との位相差を打ち消すように調整し得る装置を有する請求項8に記載の装置。
【請求項10】 金属薄膜上における化学反応又は物質間の相互作用により新たに生じた偏光の位相を検出、定置できる装置を有する請求項9に記載の装置。
【請求項11】 金属薄膜上における化学反応又は物質間の相互作用が生起する前に、反射光における偏光のp成分とs成分との位相差を打ち消すように調整し得る装置により反射光の光量をゼロとし、金属薄膜上における化学反応又は物質間の相互作用により新たに生じた偏光の位相差による反射光の光量を検出、定置できる装置を有する請求項8～10のいずれかに記載の装置。
【請求項12】 金属薄膜上での化学反応又は物質間の相互作用が、抗原－抗体反応、錯体形成反応又は受容体との反応である請求項1～11のいずれかに記載の装置。
【請求項13】 金属薄膜上での化学反応が抗原－抗体反応である請求項12に記載の装置。
【請求項14】 測定した値を記録、処理することができる装置をさらに有する請求項1～13のいずれかに記載の装置。
【請求項15】 入射光の光源が、2種以上の波長の異なる光源となるものである請求項1～14のいずれかに記載の装置。
【請求項16】 入射光の光源として、2種以上の波長の異なる光源をもちいることを特徴とする表面プラズモン共鳴 (S P R) 装置。
【請求項17】 請求項1～16のいずれかに記載する装置を用いて表面プラズモン共鳴 (S P R) を測定する方法。
【請求項18】 金属薄膜上における化学反応等により新たに生じた偏光の位相差の有無を検出、定置する請求項17に記載の方法。
【請求項19】 金属薄膜の表面に抗原又は抗体を固定化した金属薄膜を用いて、請求項17又は18に記載の表面プラズモン共鳴 (S P R) を測定する方法により検体中の抗体又は抗原を検出又は定置する方法。
【請求項20】 金属薄膜の表面に受容体を固定化した金属薄膜を用いて、請求項17又は18に記載の表面プラズモン共鳴 (S P R) を測定する方法により検体中の前記受容体に結合する物質を測定又はスクリーニングする方法。
【請求項21】 金属薄膜の表面に抗原若しくは抗体又は受容体を固定化した金属薄膜を用いた請求項15～16のいずれかに記載の表面プラズモン共鳴 (S P R) 測定装置により検体中の抗体若しくは抗原又は受容体に結合する物質を検出又は定置するための装置。
【請求項22】 請求項17又は18に記載の検出又は定置する方法のための抗原若しくは抗体又は受容体そのの表面に固定化された金属薄膜。
【発明の詳細な説明】
【0001】
【発明の属する技術分野】 本発明は、新規な表面プラズモン共鳴 (S P R) の装置及び測定方法に関する。より詳細には、本発明は、表面プラズモン共鳴 (S P R) 装置において、共鳴シグナルを金属薄膜で反射された反射光の偏光、好ましくは偏光のp成分とs成分との偏光成分により測定することを特徴とする表面プラズモン共鳴 (S P R) 装置及びそれを用いた測定方法に関する。
【0002】
【従来の技術】 現在の生化学・分子生物学・細胞生物学は、主としてタンパク質間の相互作用、あるいは、タンパク質と他の分子との相互作用が研究の対象とされてきている。また、病気の診断、測定の分野においては、抗原、抗体反応などの蛋白質間の相互作用又は蛋白質と他の分子との相互作用が多数利用されてきている。これらの蛋白質の作用については、種々の生化学、生化学的又は分子生物学的方法で検出、同定されているが、いすれの方法も蛋白質間の相互作用をリアルタイムで測定するものではない、相互作用、例えば反応の結果を測定することしかできないものであった。また、これらの測定法の多くは蛋白質などを標識化しなければ測定することができないものであった。さらに、実際のタンパク質同士の相互作用を解析するためには、速度論的な解析がきわめて重要になってくるが、従来の測定装置では速度論的な解析は大変な作業となることが多かった。
【0003】 一方、表面プラズモン共鳴 (S P R (Surface Plasmon Resonance))

30

40

3
は、1971年、クレッチェマン(Kretschmann)により光触媒による表面プラズモン増強法が確立され、それから11年後、SPRが初めてナイランダ(Niander)らによってセンサーとしてガスセンシングに応用された例が報告された。1980年代後半には、チオール、スルフィド類等の金表面に対する自己吸着の研究が行われ、カルボキシルやアミノ基など様々な官能基をもったアルキルチオール類で金表面を修飾した自己吸着性単分子膜(Self-Assembled Monolayer)の研究例が報告された。1993年、金表面の自己吸着性単分子膜(Self-Assembled Monolayer)上にポリマーを膜として固定化し、ポリマー中の活性部位に抗原・抗体などの特異的な反応を示すリガンドを固定したバイオセンサーが開発され、定性・定量分析や反応プロセスの解析などに用いられるようになった。また、この頃から小型化を目的とした光ファイバー型SPRセンサーの研究例が報告され、従来の光源の波長を一定にし、試料への共鳴の起こる入射角を測定する方法から、光の入射角を一定にし波長を変化させるセンサー装置が開発された。

【0004】また、表面プラズモン共鳴 (SPR) のような測定は、エナプテセント波を用いて間接的に試料の末端変化を測定するデバイスである。例えば、金属薄膜の表面で生起している化学反応を当該金属薄膜の裏面から測定することができる測定装置である。このため、測定に使われるレーザー光の通る部位と試料が存在する部位が異なることから、金属薄膜センサー表面で起こる各種の反応が相互作用をリアルタイムでかつ連続的に測定することができ、測定に使用する光は試料に直接照射されないで試料の着色、濁りや気泡などの影響を受けにくい、及び、金属薄膜センサーの狭い領域での光学特性を測定するために必要とする試料層の量が極めて少なくてすむ、という極めて特殊な特性を有している。したがって、表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いることにより、金属薄膜センサー上で生起する相互作用や化学反応を、測定系による影響を受けることなく、リアルタイムで連続的に測定することができる。さらに、表面プラズモン共鳴 (SPR) では複雑物質を介さずに測定であるという点で、従来から感敏性の検査や診断の分野において利用されてきたRIAやELISAなどの免疫測定法をSPR法に置き換えるためのセンサーデバイスとして注目されている測定法である。

【0005】SPR (Surface Plasmon Resonance) センサーは、金や銅などの金属薄膜表面に発生する表面プラズモン共鳴現象を利用して、金属薄膜表面付近の屈折率変化を検出するデバイスである。表面プラズモンでは、金属-誘電体界面に生じる電子の高密度の一種であり、その波数は金属薄膜表面に接する数100nmまでの試料のひざや分子性 (誘電率、屈折率) によって変化する。この変化を直接測定

することは不可能なため、SPRセンサーではレーザー光を試料の反射面から当てエナプテセント波を発生させ、これが表面プラズモンと共鳴する時のレーザーの反射角変化又は反射強度の変化を測定することで表面の状態の変化を間接的に測定するのが一般的な方法となっている。

【0006】SPR測定法の例を図1に示す。図1の装置では光源に発光ダイオードを用い、波長760nmの仙光をプリズムでスキャターエイスを介して装置させたセンサー部にオプトミカターエイスを介して装置させたセンサーチップに全反射の条件下で照射している。すると金薄膜側にエナプテセント波が生じ、金薄膜の自由電子上のプラズモンの共鳴に使われるため、固定したダイオードプリズムでの反射光の強度を測定すると、図2に示されるような「光の谷」が認められる。そして、例えば金薄膜を形成したセンサーチップ上に抗体を固定化し、この抗体が特異的に認識する抗原を含む試料を注入すると、特異的な抗原-抗体反応によりセンサーチップ表面の質量が増加し、その結果としてセンサーチップ表面の屈折率が増加する。この屈折率の実際の裏面又は端面の変化に応じて前記の「光の谷」は図2に示されるように角度変化又は反射強度変化の谷点からB点へと移動するため(図2では角度変化を示す。)、この移動度の経時変化をセンサーチップと呼ぶグラフとして表示することにより、センサーチップ表面での分子の相互作用をリアルタイムにモニターすることができ。

【0007】この「光の谷」の移動度を表わす単位として、SPR角度の0.100の変化が10000レナンスユニット(RU)と定義されており、1000RUはセンサーチップ表面でのタンパク質の約1ng/mm²の質量変化に相当することが確認されている。従来測定においては10RU程度からの変化を観察することができ約0.01ng/mm²の質量変化を検出することが限界とされている。

【0008】
【例1が解決しようとする課題】このようにSPRは他の光学測定装置とは異なる特異的な特徴を有しているために、今後SPRセンサーは、医療分野での遺伝子診断装置や、医薬品分野の新薬薬剤設計などに有効に利用され得る新しい測定装置としての期待されている。そのため、より精度を上げるためには、0.01度以下の反射角を精密測定しなくてはならないことや、乱反射によるノイズが大きき精密な測定が困難であることや、さらに、試料の屈折率、分子の反応速度、溶媒の性状などは温度により微妙に異なるものである。光学測定部分の温度を4-40℃の範囲で一定温度に厳密に制御することが難しいという課題があり、広く普及するにはまだ多くの問題が残っている。

【0009】本発明は、前述で、高精度で、高信頼性で、かつ安定したSPRの測定が可能な新規なSPR装

5
置及びその測定方法を提供するものである。また、本発明はリアルタイムの化学反応、特に抗原-抗体反応を高精度、高信頼性で測定できる新規な装置及び測定方法を提供するものである。

【0010】
【課題を解決するための手段】本発明者らはSPRの特徴を生かしながら、SPRの直面している問題点を解決するために鋭意研究したところ、SPRの測定を偏光を用いてその偏光成分を測定することにより、前述で高精度なSPR測定ができることを見出した。

【0011】本発明は、表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置において、金属薄膜で反射された反射光の偏光を測定し得る装置を有していることを特徴とする表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置に関し、より詳細にはSPR装置における反射光を仙光に分ける装置が、仙光のp成分とs成分を測定可能な分け、それらの各成分を測定することからなるSPR装置に関する。また、本発明はSPRの測定において、反射光の偏光を測定することからなるSPR測定方法に関し、より詳細には、SPRの測定における反射光を偏光成分に分け、分けられた偏光のp成分とs成分を測定し、それらのデータをデータ処理することからなるSPRの測定方法に関する。

【0012】本発明のSPR装置は、例えば図1における従来のSPR装置の反射光の検出部の前に、偏光子などの光を偏光成分に分ける装置を設置し、この偏光装置により取り出された仙光を検出部で検出することと特徴とするのである。図3は、本発明の偏光を用いたSPRの検出結果を例示するものである。図3は金薄膜センサーのSPRスベクトルである。図中、細い点線は本発明の偏光にした後の偏光のp成分のSPRスベクトルを示し、破線は偏光のs成分のSPRスベクトルを示し、太い実線は両者の境、即ち (p成分の強度) / (s成分の強度) の値を示している。

【0013】この結果からも明らかのように、SPRの反射光を偏光にして、それを偏光のp成分及びs成分に分けて測定することにより、仙光のp成分がSPRの吸収スペクトルを示すのに対して、偏光のs成分はSPRの形勢あまり受けないものであることが判明した。即ち、SPRの検出結果は偏光のp成分に主として表れるものである(図3の細い点線)、偏光のs成分はSPRの結果を反映しないものであり、従ってSPRの測定時のバックグラウンドを示すものであることが判明した(図3の破線)。さらに、得られた偏光のp成分及びs成分の強度 (intensity) を加工、処理して両者の相対値で示すことにより、従来のSPRスベクトルに比べて極めて鮮明なSPRスベクトルが得られることがわかった。例えば、図3に示すように、s成分の強度をバックグラウンドと仮定して両者の商 (p成分の強度) / (s成分の強度) を当該相対値として示すと、図3に示されるように極めて鮮明なスペクトルとなることが

6
わかる (図3の太い実線)。
【0014】従ってSPRは、金属表面で起きている作用を金属の裏面から測定するものであり、かつ金属表面で起きている作用も化学反応や物質と物質の微細な相互作用であり、従ってSPRは測定法が簡易なため、感度が低くかつノイズも多く、さらに光源の強度分布などのノイズに強く依存しており、ノイズを除去し感度を上げることは非常に困難にされていたが、本発明の方法は偏光を用いるという画期的な操作により、ノイズの多くの部分を含むバックグラウンド分を偏光のs成分の測定により簡単に計測することができ、同時に偏光のp成分によりSPRスベクトルを確実に補正することができるので、ノイズの除去と感度の向上とを同時に達成することができる。

【0015】
【発明の実施の形態】以下に本発明のSPR装置及びSPRの測定方法についての実施の形態を具体的に説明するが、本発明はこれらの具体的な装置及び方法に限定されるものではなく、本発明の技術的思想に基づいてSPR装置及びその方法並びにそれに付帯する技術の一切は本発明の技術的範囲に属するものである。

【0016】本発明のSPR装置の例を図4に示す。図4中の1は金薄膜であり、2は金薄膜1の表面に取り付けられた試料セルである。試料セル2に検体を流し金薄膜1の表面で化学反応や物質間の相互作用などを生起させる。3はプリズムであり、金属薄膜1から発射された光は光学系レンズ及び6により集光されて、プリズム3に照らしている金箔板2の裏面で反射され、反射光は光学レンズ7で平行光とされ、偏光板8により偏光を調整し、平行光は偏光ビームスプリッター9により偏光のp成分とs成分に分離される。各々の偏光成分はそれぞれCCDカメラ10及び11で測定され、得られた画像情報は情報処理装置12に転送され、データ処理が行われる。測定されたデータやデータ処理装置12などで処理されたデータを、測定した仙を記録、処理することができ、その装置に記録することもできる。また、必要に応じてこれらのデータを印刷したり表示することもできる。本発明は、SPR装置において偏光ビームスプリッター9を設けて偏光のp成分とs成分を分離して測定することとを特徴とするものである。

【0017】本発明のSPR装置における反射光を偏光にする装置としては、偏光板や偏光子などの公知の装置を使用することができ、また、偏光を検出、定量する装置もCCDカメラなどや他の公知のものを使用することができ、必要に応じてこれらの装置をSPR装置に設計変更することもできる。これらの装置で得られた偏光のp成分の値とs成分の値は、その片方のみを測定データとすることもできるが、両成分の値を同時に測定するのが好ましい。また、両成分のSPRスベクトルデー

タをそのまま使用することもできるが、これらの成分の値をデータ処理装置12などの装置によりデータ処理するのが好ましい。これらの成分の値をデータ処理する方法としては、前記した商をとる方法に限定されるものではなく、両者の差(例えば、s成分の強度) - (p成分の強度) をとつてもよいし、他の処理方法を採用することもできる。

【0018】また、偏光のp成分とs成分との間には位相が生じる場合もあり、両者の位相差を測定することもできる。S P Rは、化学反応や物質間の相互作用をリアルタイムで連続的に測定できるものだから、前記の偏光成分の位相差を利用して金属薄膜表面での化学反応や物質間の相互作用が起こったか否かを極めて高感度で検出、定量することが可能となる。例えば、図2に示されるように、金属薄膜の表面で化学反応や物質間の相互作用が生起すると、金属表面の状態が変化し、その結果S P Rスベクトルの吸収を示す角度に変化が生じる(図2のAからBへの変化)。従来はこれを吸収スベクトルとして相対的な値により測定していたのであるが、本発明の位相差を用いる偏光成分の測定方法によれば、まず図2のAの状態(反応や相互作用の生起する前の状態)において偏光のp成分とs成分の位相差をキヤンセルするようにしておき、即ちいずれの偏光も観測することができない状態にしておき、次いで金属薄膜表面において化学反応や物質間の相互作用が生起するとこれにより新たな偏光の位相差が生じるために偏光のp成分とs成分の位相差を観測することができるようになる。

【0019】このような測定方法は、従来の吸収スベクトルのような相対的なものではなく、新たな偏光による観測可能な光量があるか無いかという絶対的なものであるから、極めて高感度で測定を行うことが可能となる。したがって、本発明は、S P R装置において反射光における偏光のp成分とs成分との位相差を打ち消すように調整し得る装置をさらに有するものを包含するのである。

【0020】本発明のこのようなS P R装置の例を図5に示す。図5は光源24としてレーザを用いた例を示している。また、入射光として偏光子26をとおした偏光を用いた例が示されている。偏光された入射光はプリズム21の裏面を通過し、反射光としてプリズム22から出る。プリズム23から出た反射光は、偏光の成分とs成分との位相差を打ち消すように調整し得る装置の1種である補償板3に入り、例えば、試料セル22における反応等の間の状態では補償板3からの光量が無いように、即ち光がゼロになるように調整される。補償板3の後は検光子29が設けられ、その後に出、定量できる検出器31がある。試料セル22で化学反応が生起してS P Rスベクトルが変動すると、偏光の位相差が変動し、予め調整された補償板3から試料

セル22における化学反応等に應じた光量が検出器31によって検出されることになる。

【0021】偏光子26としては、偏光が得られるものであればよく、通常の偏光子を使用することができ、適宜S P R装置に適した方式等に設計変更することもできる。また、前記偏光のp成分とs成分との位相差を打ち消すように調整し得る装置33としては、ハーフウェープレートや補償板やクォーツクリスタルの補償器などの補償器(コンペンセーター)などを用いることができるがこれに限定されるものではない。検出器31によって得られたデータはデータ処理装置32により適宜データ処理される。

【0022】図6はこの装置によるS P R応答のセンサグラムを例示する。横軸は時間であり、縦軸は光子数を示す。金属薄膜の表面での化学反応や物質間の相互作用が生じる前の定常状態になったときに、偏光のp成分とs成分との位相差がゼロとなるように調整し得る装置33により光量がゼロとなるように調整する。次いで、金属薄膜の表面に抗体などを流し、この装置の表面で化学反応や物質間の相互作用が生じるようにする。図6に示す1時間後に金属薄膜の表面で目的の化学反応や物質間の相互作用が生じると、S P R応答が変化し、光がゼロに調整されるところから光量が観察できるようになる(図6のt時間後の部分参照)。この場合の光量は、光子単位で測定することも可能である。このように本発明のこの装置によれば、光子単位での測定が可能であり、極めて高感度でS P R応答を測定することができるようになる。本発明においては、この方法をゼロメソッドS P Rと称する。

【0023】このような本発明の装置を使用することにより、金属薄膜上における化学反応や物質間の相互作用等により新たに生じたS P Rの微弱な変動を偏光の位相差の有無により検出、定量することができるようになり、金属薄膜表面で起きた化学反応や物質間の相互作用等を極めて高感度で検出、定量することが可能となる。例えば、金属薄膜表面にある抗体を固定化しておき、その状態でのS P R装置の反射光の偏光の位相差を打ち消すように調整しておき、即ち光量を全く観測することができない状態にしておき、次いで、抗体が固定化されている金属薄膜表面とその抗原を含む抗体を流す。当該抗体中にその抗体に対する抗原-抗体反応が生じると、金属薄膜表面において抗原-抗体反応が生じ、S P Rの吸収反射角が変動することになるが(図2参照)、本発明のS P R装置によれば前記の光量が全く観測されない状態から新たな位相差により光量が観測される状態に変化することになる。この新たな位相差に基づく光量を測定することにより、検体中に抗原が含有されているか否かを検出し、定量することが可能となる。

【0024】本発明のS P R装置における入射光としては、従来のS P R装置の入射光をそのまま使用すること

もできるが、入射光を偏光とすることもできる。このような装置としては、例えば前記した図5に示すような装置を挙げることができる。また、本発明のS P R装置の光源としては、従来から使用されているLEDに照らす、レーザ光などの種々の光源を使用することができ、光源の波長も種々の波長をも使用することができ、光源の波長としては、可視領域、赤外線域、紫外領域などの広い範囲の波長を選択することができる。さらに本発明からの知見によれば、一般に、光線の波長が長くなるほど金属薄膜の表面から遠くにある物の反応や作用を観測することができるとされているので、金属薄膜の表面から近い位置の反応や作用を観測したい場合には、波長の短い光源を、また金属薄膜の表面から遠くの位置にある反応や作用を観測したい場合には波長の長い光源を使用するのが好ましい。

【0025】また、波長の異なる2以上の光源を同時に使用することにより、金属薄膜の表面から異なる位置にある物質の反応や作用等を同時に観測することができ、2種以上の光源の波長の相違の程度は、反射光においてこれらの波長を各々分離することができるとする程度に相違するものであればよく、また、観測したい金属表面からの距離に応じて適宜決定することができ、波長の異なる2種の光源を用いた本発明のS P R装置の例を図7に示す。光源51と光源52は、波長の異なるLED光源であり、光源51及び光源52から発射された光は、ダイクロイックミラー45により平行入射光とされ、次いで光学系レンズ46により集光されてプリズム43に入射される。入射された光は、表面に試料セル42を有する金属薄膜41の裏面から反射され、プリズム43を出て光学系レンズ47で元の平行光とされた後、ダイクロイックミラー48によりそれぞれの波長に分離される。分離された反射光をそのまま従来の方法、例えばCDカメラなどで観測することもできる。

【0026】ダイクロイックミラー48により分離された各波長の反射光を観測すれば、金属薄膜の表面に取り付けられた試料セル42で生起している化学反応や相互作用などの金属薄膜41の表面から異なる位置にある物質の反応や作用等を同時に観測することができることになる。したがって、本発明は波長の異なる2種以上の光源を用いるS P R装置及びそれを用いたS P R測定方法にも関する。また、図7に示すようにダイクロイックミラー48により分離された各波長の反射光を、本発明の方法に従って偏光ビームスプリッター49を用いて偏光成分に分け、偏光のp成分とs成分とをそれぞれ観測することもできる。これにより、さらに高感度で試料セル中の金属薄膜の表面からの距離の異なる位置にある物質の挙動を把握することができ、さらに、2つの波長で測定した各波長のS P R成分の差を計算することにより、金属薄膜からの特定の領域の部分の挙動を高精度で測定することができるようになる。このとき、波長を接

近させると、金属薄膜の厚み方向の離れた部分の挙動を高精度で測定することができるようになり、このデータを処理してゆくことにより、厚み方向の解像度を上げることができることになる。

【0027】本発明のS P R装置について詳細に説明してきたが、本発明のS P Rは、第一に測定系の光を偏光成分に分離して測定することを特徴とするものであり、第二に分離した種々の偏光成分からのデータをデータ処理することを経ることも特徴とするものであり、第三に入射光として偏光を用いることを特徴とするものであり、第四に偏光成分の位相差を利用して観測される光量の有無による高感度の測定ができることを特徴とするものであり、第五に入射光として波長の異なる2種以上の光源を使用することを特徴とするものであり、第六にこれらの本発明の特徴を組み合わせて使用することができることを特徴とするものである。

【0028】本発明のS P Rの装置及びその測定方法における測定対象としては、金属薄膜上で生起し得る化学反応や物質間の相互作用などであれば特に制限はなく、本発明においてはこれらをまとめて「化学反応や物質間の相互作用」というが、これは通常の化学反応や物質間の相互作用) といふのが、分子や分子の集合体の挙動、膜や物質の構造変化、結晶構造の変化などのS P Rで測定可能なあらゆる変化を包含するものである。例えば、金属薄膜上で起る化学反応や物質間の相互作用が抗原-抗体反応や受容体との反応などの基質特異的な反応、錯体形成反応などの非特異結合相互作用などが挙げられる。また、DNA断片などのプローブを固定し、ハイブリダイゼーションの平衡を測定対象とすることも考えられる。現在多くの診断や検査において抗原-抗体反応が利用されているが、その多くは放射性同位元素を用いたRIA法や、酵素を用いたEIA法や、蛍光標識抗体を用いたFIA法などであるが、本発明のS P Rの装置や測定方法を用いることにより、これらの抗原-抗体反応を標識化を行うことなく、より簡便で、かつ迅速な測定が可能となり、本発明は診断や検査における新たな手法を提供するものである。標識化の必要のない点はプローブを用いたハイブリダイゼーションにおいても同様である。

【0029】本発明の方法により抗原-抗体反応を測定する場合には、例えば、検査の対象となる抗原又は抗体を金属薄膜上に固定し、本発明の方法により、例えば、金属薄膜の表面にメルカプト化合物などを用いて抗原を固定化し、これに抗体を導入すると、検体中に固定化された抗原と反応する抗体が存在すると抗原-抗体反応が起り、S P Rスベクトルが反応のものから反応後の状態に変動し、これを偏光成分に分離したジグザグとして観測することにより、検体中の抗体の存在を知ることができる。

【0030】また、金属薄膜の表面に設けられた試料セ

りに2以上の方向から検体と検出試薬とを導入し、検出試薬又は検体が導入された時のSPRスベクトルの変動を前記と同様に検出して、検体の検査を行うこともできる。本発明の方法によれば、目的の検査対象に適合した抗原若しくは抗体が金属薄膜の表面に固定化された金属薄膜又は抗原若しくは抗体などの検出試薬を導入できる試料をを用いることにより、標識化などの煩雑な操作を必要としない簡便で迅速かつ高感度の抗原-抗体反応を測定することができる。

【0031】本発明の方法により受容体との反応を測定する場合には、例えば、前記した方法などに準じて金属薄膜の表面に受容体を固定しておき、これに受容体に結合し得る又はその可能性のある物質を含有する検体を試料液に導入する。検体中の物質が受容体と結合するとSPR応答を観測することができる。本発明のSPR装置は極めて高感度であるために、固定化された受容体数が少なくてもSPRを応答を測定することが可能となる。また、受容体との結合が比較的弱い場合においても本発明のSPR装置によれば、SPR応答を測定することとが可能となる。例えば、金属薄膜の表面に女性ホルモンの受容体を固定化しておき、これに環境ホルモンとなる疑いのある物質を含有する検体を導入すると、極めて高感度で女性ホルモン受容体との結合性の有無およびその程度を知ることができる。したがって、本発明は、本発明のSPR装置を用いた特定の受容体に結合する物質をスクリーニングする方法を提供するものである。本発明のこのスクリーニング方法によれば、環境ホルモンなどの有害物質の探索や特定の受容体の結合剤などの開発に有用となる。

【0032】

【発明の効果】本発明は、測定系に偏光を映出、定量する手段を採用することにより、簡便、高精度、高信頼性で、迅速かつ安定した表面プラズモン共鳴（SPR）の測定装置及び測定方法を提供するものである。また、本発明はSPR装置を用いた標識化などの煩雑な操作を必要としない簡便で迅速かつ高感度の抗原-抗体反応や受*

* 受容体との反応を測定する方法及びその装置を提供するものである。本発明のSPR装置は極めて高感度であるために、受容体との反応やハイブリダイゼーションなどの微弱な反応を検出することができ、生化学分野にも広く応用されるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、従来のSPR装置の概要を示すものである。

【図2】図2は、従来のSPRスベクトルを示すものである。

【図3】図3は、金属膜を用いたSPRにおいて、本発明の偏光成分に分けたSPRスベクトルを示す。

【図4】図4は、本発明の偏光成分に分けたSPR装置を示すものである。

【図5】図5は、本発明の偏光成分の位相差を利用したSPR装置を示すものである。

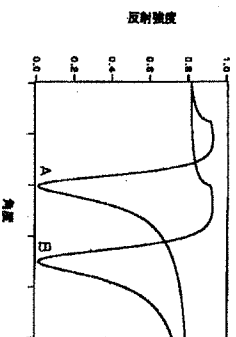
【図6】図6は、本発明の偏光成分の位相差を利用したSPR装置によるSPR応答のセンサグラムを示すものである。

【図7】図7は、本発明の2以上の光源を用いたSPR装置を示すものである。

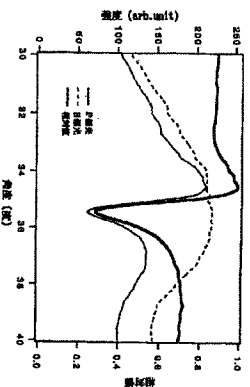
【符号の説明】

- 1 金属薄膜
- 2 試料セル
- 3 プリズム
- 4 光源
- 8 偏光子
- 9 偏光ビームスプリッター
- 10 検出器
- 12 データ処理装置
- 26 偏光子
- 29 検光子
- 33 補償器
- 45 ダイクロイックミラー
- 48 ダイクロイックミラー
- 49 偏光ビームスプリッター

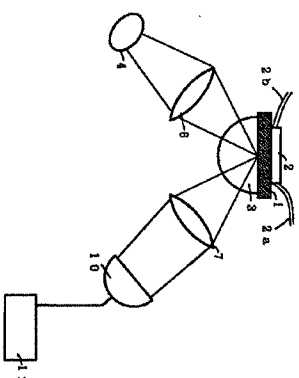
【図2】



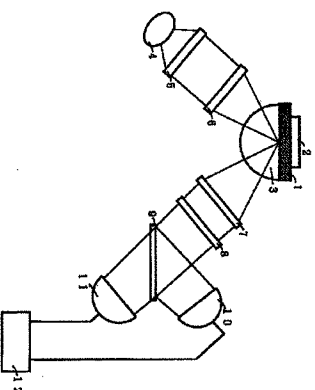
【図3】



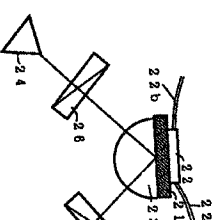
【図1】



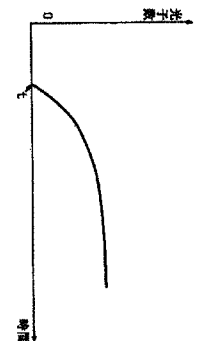
【図4】



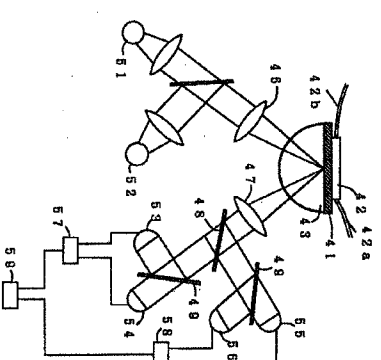
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(71)出願人	000102739	(72)発明者	飛田 達也
	エヌ・アイ・アイ・アドバンステクノロジ株式会社		東京都新宿区西新宿二丁目1番1号新宿三井ビル
(72)発明者	鈴木 孝治		エヌ・アイ・アイ・アドバンステクノロジ株式会社内
	神奈川県川崎市幸区小倉1丁目1-A70513	(72)発明者	岩崎 弦
			神奈川県厚木市長谷1182-1 ベルフラワーマイツ5-408
(72)発明者	栗原 一嘉	Fターム(参考)	2G054 AA02 AB04 CA21 CD03 EA05
	神奈川県川崎市中原区井田杉山町13の22		EB01 FA11 FA18 FA20 GA01
	みやこ荘202		GA05
(72)発明者	丹羽 修		2G039 AA01 CC16 DD13 EE02 EE04
	神奈川県厚木市長谷1181-1 ベルフラワーマイツ長谷3-201		GG01 GG04 HH01 HH06 JJ12
			JJ13 JJ19 MM01